

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 <b>C12N 9/28, C11D 3/386</b>	<b>A1</b>	(11) 国際公開番号 <b>WO 94/26881</b>  (43) 国際公開日 1994年11月24日(24.11.94)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/00805 (22) 国際出願日 1994年5月19日(19. 05. 94)  (30) 優先権データ 特願平5/117392 1993年5月19日(19. 05. 93) JP  (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 花王株式会社(KAO CORPORATION)[JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号 Tokyo. (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 荒 勝俊(ARA, Katsutoshi)[JP/JP] 〒323 栃木県小山市中久喜5-12-3 Tochigi. (JP) 佐伯勝久(SAEKI, Katsuhisa)[JP/JP] 〒329-11 栃木県河内郡河内町中岡本3715-143 Tochigi. (JP) 五十嵐一寿(IGARASHI, Kazuaki)[JP/JP] 〒329-06 栃木県河内郡上三川町上涌生2166 Tochigi. (JP) 高岩美喜雄(TAKAIWA, Mikio)[JP/JP] 〒328 栃木県栃木市平井町859-4 Tochigi. (JP) 上村隆明(UEMURA, Takaaki)[JP/JP] 〒314-03 茨城県鹿嶋市波崎町土合本町1-8762-23 Ibaraki. (JP) 川合修次(KAWAI, Shuji)[JP/JP] 〒329-11 栃木県河内郡河内町立伏471-199 Tochigi. (JP)		伊藤 進(ITO, Susumu)[JP/JP] 〒321 栃木県宇都宮市東条町3441-64 Tochigi. (JP) 萩原 浩(HAGIWARA, Hiroshi)[JP/JP] 〒321-34 栃木県宇都宮市貝町赤羽2606-6 Tochigi. (JP) 小林 命(KOBAYASHI, Tohru)[JP/JP] 〒320 栃木県宇都宮市湯殿台2-12-1 Tochigi. (JP) 田中可史(TANAKA, Atsushi)[JP/JP] 〒640 和歌山県和歌山市金龍寺丁4-1 Wakayama. (JP) 星野栄一(HOSHINO, Eiichi)[JP/JP] 〒640 和歌山県和歌山市舟屋町3-32-3 Wakayama. (JP) (74) 代理人 弁理士 有賀三幸, 外(ARUGA, Mitsuyuki et al.) 〒103 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo. (JP)  (81) 指定国 CN, JP, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : LIQUEFYING ALKALINE $\alpha$ -AMYLASE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, AND DETERGENT COMPOSITION CONTAINING THE SAME (54) 発明の名称 液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ、その製造法及びこれを含む洗浄剤組成物 (57) Abstract <p>A liquefying alkaline <math>\alpha</math>-amylase having the following enzymological properties: (1) action: this enzyme hydrolyzes <math>\alpha</math>-1,4-glycoside linkages of starch, amylose, amylopectin and partial hydrolyzates thereof, and forms glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose and maltohexaose from amylose, though it does not act upon pullulan; (2) isoelectric point: it has an isoelectric point exceeding 8.5 as measured by isoelectric electrophoresis. This enzyme has such a liquefying activity as to hydrolyze starch and starch polysaccharides at high random and has an optimum pH value on an alkaline side. Since it has a high isoelectric point, it can readily be purified. A detergent composition containing this enzyme has an excellent detergency against especially stains due to spilt food.</p>		

## (57) 要約

本発明は、次の酵素学的性質を有する液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ、その製造法及びこれを含有する洗浄剤組成物に係るものである。

### 1) 作用

澱粉、アミロース、アミロペクテン及びそれらの部分分解物の $\alpha$ -1, 4グルコシド結合を分解し、アミロースからはグルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース及びマルトヘキサオースを生成する。但しプルランには作用しない。

### 2) 等電点

等電点電気泳動法による等電点は8.5を超える。

本アミラーゼは、澱粉・澱粉系多糖類を高ランダムに分解する液化型活性を有し、アルカリ側に至適pHを有する。また高い等電点を有するため簡易に精製できる。これを配合した洗浄剤は、特に食べこぼし汚れに対する洗浄力に優れる。

#### 情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	CZ	チェコスロバキア共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド
AT	オーストリア	DE	ドイツ	KR	大韓民国	PL	ポーランド
AU	オーストラリア	DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BB	バルバドス	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BE	ベルギー	ES	スペイン	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BF	ブルキナファソ	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BG	ブルガリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BJ	ベナン	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BR	ブラジル	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BY	ベラルーシ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
CA	カナダ	CN	中国	MG	マダガスカル	TD	チャド
CF	中央アフリカ共和国	GR	ギリシャ	ML	マリ	TG	トーゴ
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TT	トリニダードトバゴ
CI	コートジボワール	IT	イタリア	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	JP	日本	NE	ニジェール	US	米国
CN	中国	KE	ケニア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
CS	チェコスロバキア	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	VN	ベトナム

## 明 細 書

液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ、その製造法及びこれを含有する洗浄剤組成物

## 技術分野

本発明は洗浄剤の配合成分として有用な液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ、その製造法及びこれを含有する洗浄剤組成物に関する。

## 背景技術

$\alpha$ -アミラーゼは、澱粉、アミロース、アミロペクチン等の澱粉系多糖類の分子中の $\alpha$ -1, 4グルコシド結合のみを切断する酵素で、1833年にPayenとPersozにより麦芽抽出液より初めて見出されて以来、バチルス ズブチリス マールブルグ (*Bacillus subtilis* Marburg)、バチルス ズブチリス ナットウ (*Bacillus subtilis natto*)、バチルス アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス セレウス (*Bacillus cereus*)、バチルス サーキュランス (*Bacillus circulans*)、バチルス マセランス (*Bacillus macerans*)、シュードモナス シュツツツェリ (*Pseudomonas stutzeri*)、クレブシェラ アエロゲネス (*Klebsiella aerogenes*) 等のバチルス属を中心とする細菌、ストレプトマイセス グリセウス (*Streptomyces griseus*) 等の放線菌、アスペルギルス オリザエ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) 等のアスペルギルス属を中心とするカビ類、イネ科及びマメ科植物の種子、ヒト及びブタなどの動物の消化腺など多くの生物から結晶標品あるいは電気泳動的に均一な標品として得られている。

$\alpha$ -アミラーゼは昔から醸造産業で穀類やイモ類の糖化、繊維産業で澱粉糊抜き剤、医薬品産業で強力な消化剤としての利用、食品産業で水飴の製造等に広く

利用されてきた。

最近、我々は斯かる $\alpha$ -アミラーゼを枝切り酵素と共に食器用洗浄剤及び衣料用洗浄剤に配合することにより、主に澱粉汚れに対して洗浄力が飛躍的に向上することを見出し、特許出願した（特開平2-132192号公報）。

しかしながら、自然界において従来見出されている $\alpha$ -アミラーゼのほとんどが、中性乃至酸性領域において最大且つ安定な酵素活性を示す、所謂中性若しくは酸性の $\alpha$ -アミラーゼに分類されるものであり、pHがアルカリ側にある界面活性剤含有液中では活性が低下してしまうという欠点があった。これに対し、アルカリ領域で最大活性を示すか、あるいはアルカリ耐性を有する $\alpha$ -アミラーゼ、所謂アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ及びアルカリ耐性 $\alpha$ -アミラーゼは、かかる欠点がなく、洗浄剤の配合成分として有用である。このようなアルカリ $\alpha$ -アミラーゼ及びアルカリ耐性 $\alpha$ -アミラーゼの存在は、バチルス A-40-2 株の生産する酵素〔Agric. Biol. Chem., 35, 1783 (1971)〕、バチルス NRRL B-3881 株の生産する酵素〔J. Bacteriol., 110, 992 (1972)〕、ストレプトマイセス属 KSM-9 (Streptomyces sp. KSM-9) の生産する酵素（特開昭61-209588号公報）、バチルス H-167 (Bacillus sp. H-167) 株の生産する酵素（特開昭62-208278号公報）、バチルス アルカロサーモフィラス A3-8 (Bacillus alcalothermophilus A3-8) 株の生産する酵素（特開平2-49584号公報）及びナトロコッカス属 Ah-36 株（特開平4-211369号公報）が知られているのみである。尚、ここでアルカリ $\alpha$ -アミラーゼとは、至適pHがアルカリ領域にあるものをいい、アルカリ耐性 $\alpha$ -アミラーゼとは、至適pHは中性から酸性領域にあるが、アルカリ領域においても至適pHにおける活性に比較して十分に活性を有しかつ安定性を保持するものをいう。また、中性とはpH6~8の範囲をいい、アルカリ性とはそれ以上のpH範囲をいう。

しかしながら、本発明者らの知るかぎり、これらのアルカリ酵素のほとんどは、澱粉又は澱粉系多糖類をグルコース、マルトース又はマルトトリオースにまで低分子化させる、所謂糖化型 $\alpha$ -アミラーゼに属するものであるため、糖の製造用

酵素としては好適であるが、洗剤用酵素としては問題があった。そこで、本発明者らは、界面活性剤に対する耐性を有し、かつ澱粉又は澱粉系多糖類を高ランダムに分解する、所謂液化型 $\alpha$ -アミラーゼに着目し検討を行ったところ、従来のアルカリ $\alpha$ -アミラーゼとしては糖化型の特性を示すものが知られているのみで、液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼについては全く報告されていないことが明らかとなった。

また、上記従来のアルカリ $\alpha$ -アミラーゼの取得には数ステップの精製工程を要し、工業化レベルでの酵素精製方法としては問題があった。そこで酵素の特性を利用して簡易に精製酵素を得ることを目的として、表面電荷が高い酵素蛋白に着眼したところ、従来知られているアルカリ $\alpha$ -アミラーゼの等電点は全て3.0～8.0程度であり、本発明のような、8.5を超える高い等電点を有するアルカリ $\alpha$ -アミラーゼについては全く報告されていないことが明らかとなった。

従って、本発明は、界面活性剤に対する耐性を有し、至適pHをアルカリ領域に有し、液化型、すなわち澱粉又は澱粉系多糖類を高ランダムに分解するものであり、かつ高い等電点を有する $\alpha$ -アミラーゼ及びこれを含有する洗浄剤組成物を提供することを目的とする。

#### 発明の開示

斯かる実情において、本発明者らは、上記条件を具備する液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼを生産する微生物を自然界に求め、鋭意探索を続けてきたところ、 $\alpha$ -アミラーゼ活性とプルラナーゼ活性を有する、分子量200,000 $\pm$ 5,000の酵素を産生する微生物として先に報告（特開平3-108482号公報）したバチルス属に属する微生物の培養物中に、液化型反応特性を有する新規なアルカリ $\alpha$ -アミラーゼを見出し、更にこの酵素を洗浄剤に配合すると、従来の糖化型 $\alpha$ -アミラーゼでは不十分であった、カレー、ケチャップ等の食べこぼしによる複合的な汚れに対する洗浄力が顕著に向上することを見出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、次の酵素学的性質を有する液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ、

その製造法、及びこれを含有する洗浄剤組成物に係るものである。

#### 1) 作用

澱粉、アミロース、アミロペクチン及びそれらの部分分解物の $\alpha$ -1, 4グルコシド結合を分解し、アミロースからはグルコース(G1)、マルトース(G2)、マルトリオース(G3)、マルトテトラオース(G4)、マルトペンタオース(G5)及びマルトヘキサオース(G6)を生成する。ただしプルランには作用しない。

#### 2) 等電点

等電点電気泳動法による等電点は8.5を超える。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼの作用pHを示す図である。図2は、本発明の液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼのpH安定性を示す図である。図3は、本発明の液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼの作用温度範囲を示す図である。図4は、本発明の液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼの温度安定性を示す図である。図5は、本発明の液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼのソディウムドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動(12.5%ポリアクリルアミドゲル, 95℃, 4分処理, Quick CBB染色)の結果を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼは、洗浄剤配合成分としての観点より、至適pHを8.0~10.0の範囲内に有することが好ましい。

本発明の液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼを生産する微生物としては、高ランダムに澱粉又は澱粉系多糖類を分解する性質を有し且つ至適pHがアルカリ領域にあり、等電点の高い $\alpha$ -アミラーゼを生産する能力を有するものであれば特に限定されないが、例えば特開平3-108482号公報記載のバチルス属に属するバチルス エスピー. (Bacillus sp.) KSM-AP1378 (FERM BP-3048)が挙げられる。

上記の菌株を用いて本発明の液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼを得るには、培地

にこの菌株を接種し、常法に従って培養すればよい。培地中には、資化し得る炭素源及び窒素源を適当量含有せしめておくことが好ましい。この炭素源及び窒素源については特に制限はないが、その例としては、窒素源としてコーングルテンミール、大豆粉、コーンステープリカー、カザミノ酸、酵母エキス、ファーマメディア、肉エキス、トリプトン、ソイトン、ハイプロ、アジパワー、ソイビーンミール、綿実油粕、カルチベーター、アジプロン、ゼストなどの有機窒素源、及び硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、酢酸アンモニウム等の無機窒素源が挙げられる。また炭素源としては、可溶性澱粉、不溶性澱粉、アミロペクチン、グリコーゲン、プルラン及びこれらの部分分解により生じたオリゴ糖に加え、資化し得る炭素源、例えばグルコース、マルトース、アラビノース、キシロース、リボース、マンノース、フラクトース、ガラクトース、麦芽糖、ショ糖、乳糖、トレハロース、マンニット、ソルビット、グリセリンや資化し得る有機酸、例えば酢酸などが挙げられる。またその他、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、亜鉛塩、コバルト塩、ナトリウム塩、カリウム塩等の無機塩や、必要であれば、無機、有機微量栄養源を培地中に適宜添加することもできる。

斯くして得られた培養物中からの目的物質である液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼの採取及び精製は、一般の酵素の採取及び精製の手段に準じて行うことができる。即ち、遠心分離又は濾過等の通常の固液分離手段により菌体を培養液から除去して粗酵素を得ることができる。この粗酵素液は、そのまま使用することもできるが、必要に応じて、塩析法、沈澱法、限外濾過法、ゲル濾過法等の分離手段により粗酵素を得、更に等電点が高いことを利用してゲル等電点電気泳動法、密度勾配等電点電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー等により精製結晶化して、精製酵素として使用することも可能である。

斯くして得られる、本発明の $\alpha$ -アミラーゼは、アルカリ側に至適pHを有するのみならず、高ランダム分解性、すなわち液化型であり、かつ等電点が高いという従来のアルカリ $\alpha$ -アミラーゼと異なる特異な性質を有するものである。以下に、菌株としてバチルス エスピー. KSM-AP1378 (FERM BP-3048) を用いて得られた本発明の液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼの酵素化学



的諸性質について説明する。

なお、酵素活性の測定は次の緩衝液（各々 40 mM）を用い、以下の方法に従って行った。

pH 4 ~ 6          酢酸緩衝液

pH 6 ~ 8          トリスー塩酸緩衝液

pH 8 ~ 11        グリシンー食塩ー水酸化ナトリウム緩衝液

pH 11 ~ 12      塩化カリウムー水酸化ナトリウム緩衝液

酵素活性測定法（DNS法によるアミラーゼ活性の測定）：

各種緩衝液中に可溶性澱粉（和光純薬社製、反応系における最終濃度は 0.5 %）を溶解させた緩衝液 0.9 ml に、酵素液 0.1 ml を加え、40 °C で、30 分間反応させた。反応後、3,5-ジニトロサリチル酸（DNS）法にて、還元糖の定量を行った。即ち、反応液 1.0 ml に DNS 試薬 1.0 ml を加え、5 分間、100 °C で加熱発色させ、冷却後、4.0 ml の脱イオン水を加えて希釈し、波長 535 nm で比色定量した。酵素の力価は、1 分間に 1  $\mu$ mol のグルコースに相当する還元糖を生成する酵素量を 1 単位（1 U）とした。

（酵素化学的諸性質）

（1）作用

澱粉、アミロース、アミロペクチン及びそれらの部分分解物の  $\alpha$ -1,4 グルコシド結合を分解する。ただし、プルランには作用しない。

なお、種々の基質に対する作用を表 1 に示す。

表 1

基 質	濃 度 (%)	相対活性 (%)
可溶性澱粉 (ポテト)	0.25	100.0
アミロース (コーン)	0.25	92.3
アミロペクチン (コーン)	0.25	86.6
アミロペクチン (ポテト)	0.25	85.1
グリコーゲン (牡蠣)	0.25	73.2
デキストリン	0.25	0.0
デキストラン	0.25	0.0
プルラン	0.25	0.0

## (2) 作用pH及び至適pH

pH 5.0 ~ 11.0 付近の範囲で作用し、至適pHは 8.0 ~ 9.0 である (図 1)。

## (3) pH安定性

pH 6.5 から 10 で極めて安定であり、pH 5 ~ 10.5 においても約 50 % 以上の活性を維持する (図 2)。

## (4) 作用温度範囲及び最適温度

20 ~ 80 °C の広範囲で作用し、最適作用温度は 45 ~ 55 °C である (図 3)。

## (5) 温度安定性

本酵素について pH 8.5 の条件で温度を変化させ、各温度で 30 分間処理することにより失活の条件を調べると 50 °C までは極めて安定であった (図 4)。

## (6) 分子量

ソディウムドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定した分子量は  $50,000 \pm 5,000$  である (図 5)。

## (7) 等電点

等電点電気泳動法により測定した等電点は 9.2 付近である。

## (8) 金属塩の影響

表 2 に示す各種金属塩を反応系に共存させて 50 °C で 15 分間処理してその影

響を調べたところ、一般に水道水中に含まれる $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 及び $Al^{3+}$ に対して極めて安定であった。

表 2

金属塩	濃度 ( $\mu$ M)	残存活性 (%)
K C l	50	112.0
N a C l	50	109.1
C a C l <sub>2</sub>	1	96.8
C u C l <sub>2</sub>	1	102.9
C o C l <sub>2</sub>	1	62.5
M n C l <sub>2</sub>	1	116.9
B a C l <sub>2</sub>	1	108.7
N i C l <sub>2</sub>	1	27.2
C d C l <sub>2</sub>	1	19.5
H g C l <sub>2</sub>	1	0.0
M g C l <sub>2</sub>	1	106.7
F e C l <sub>2</sub>	1	114.4
F e C l <sub>3</sub>	1	93.2
A l C l <sub>3</sub>	1	101.5

## (9) 界面活性剤の影響

各種界面活性剤（例えば、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（L A S）、アルキル硫酸エステルナトリウム塩（A S）、ポリオキシエチレンアルキル硫酸エステルナトリウム塩（E S）、アルキルスルホン酸ナトリウム（S A S）、石鹼及びポリオキシエチレンアルキルエーテル）の0.05%溶液で40℃、30分間処理しても殆ど活性阻害は受けなかった。

## (10) 澱粉の加水分解率

ポテト由来澱粉の分解率は約32%であり、またアミロース（重合度：グルコース117個）からはグルコース（G1）、マルトース（G2）、マルトトリオース（G3）、マルトテトラオース（G4）、マルトペンタオース（G5）及びマルトヘキサオース（G6）を分解生成する。

## (11) N末端アミノ酸配列の解析

本アミラーゼのN末端アミノ酸配列をエドマン分解法 (Edman, P., Acta Chem. Scand., 4, 283 (1948)) によりプロテインシーケンサー (ABI社製) 477Aを用いて測定した結果、液化型アミラーゼ特有の共通配列 (Asn-Gly-Thr-Met-(Met)-Gln-Tyr-Phe-Glu-Trp) がN末端領域に存在することが判った。なお、液化型 $\alpha$ -アミラーゼのN末端領域に関する文献としては、J. Biochem., 98, 1147-1156 (1985)、J. Biochem., 98, 95-103 (1985) 等が挙げられる。

本発明の洗浄剤組成物への上記液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼの配合量は、ポテト由来可溶性澱粉の分解活性にして1~10,000 U/g、特に5~5,000 U/g、更に10~1,000 U/gが好ましい。

また、本発明の洗浄剤組成物には、公知の洗浄剤成分を配合することができ、当該公知の洗浄剤成分としては、例えば次のものが挙げられる。

(1) 界面活性剤：

平均炭素数10~16のアルキル基を有する直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩、平均炭素数10~20の直鎖又は分岐鎖のアルキル基を有し、1分子内に平均0.5~8モルのエチレンオキシドを付加したアルキルエトキシ硫酸塩、平均炭素数10~20のアルキル基を有するアルキル硫酸塩、平均10~20の炭素原子を1分子中に有するオレフィンスルホン酸塩、平均10~20の炭素原子を1分子中に有するアルカンスルホン酸塩、平均10~20の炭素原子を1分子中に有する $\alpha$ -スルホ脂肪酸メチルあるいはエチルエステル塩、平均炭素数8~20の高級脂肪酸塩、平均炭素数10~20の直鎖又は分岐鎖のアルキル基を有し、1分子内に平均0.5~8モルのエチレンオキシドを付加したアルキルエーテルカルボン酸塩などのアニオン性界面活性剤；平均炭素数10~20のアルキル基を有し、1~20モルのエチレンオキシドを付加したポリオキシエチレンアルキルエーテル、高級脂肪酸アルカノールアミド又はそのアルキレンオキシド付加物、またプロピレンオキシドとプロピレングリコールとの縮合物にエチレンオキシドを付加させた、プルロニックという名称で知られているものなどの非イオン性界面活性剤；その他ベタイン型両性界面活性剤；スルホン酸型両性

界面活性剤、リン酸エステル系界面活性剤、アミノ酸型界面活性剤、カチオン性界面活性剤など。

これらの界面活性剤は洗浄剤組成物中0.5～60重量%（以下単に%で示す）配合され、特に粉体状洗浄剤組成物については10～45%、液体洗浄剤組成物については20～50%配合することが好ましい。また、本発明洗浄剤組成物が漂白洗浄剤、又は自動食器洗浄機用洗浄剤である場合、界面活性剤は一般に1～10%、好ましくは1～5%配合される。

（2）二価金属イオン捕捉剤：

トリポリリン酸塩、ピロリン酸塩、オルソリン酸塩などの縮合リン酸塩、ゼオライトなどのアルミノケイ酸塩、合成層状結晶性ケイ酸塩、ニトリロ三酢酸塩、エチレンジアミン四酢酸塩、クエン酸塩、イソクエン酸塩、ポリアセタールカルボン酸塩など。

この二価金属イオン捕捉剤は、0～50%、好ましくは5～40%配合される。また、リンを含有しない二価金属イオン捕捉剤を用いることがより好ましい。

（3）アルカリ剤及び無機塩：

ケイ酸塩、炭酸塩、セスキ炭酸塩、硫酸塩、アルカノールアミンなど。

これらは0～80%、好ましくは1～40%配合される。

（4）再汚染防止剤：

ポリエチレングリコール、ポリアクリル酸塩、ポリアクリル酸コポリマー、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースなど。再汚染防止剤の一部は、二価金属イオン捕捉剤としても使用できる。

再汚染防止剤は0～10%、好ましくは1～5%配合される。

（5）酵素：

セルラーゼ、液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ以外のアミラーゼ、リパーゼ、ヘミセルラーゼ、 $\beta$ -グリコシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、プロテアーゼなどの酵素。

（6）水道水中の有効塩素の捕捉剤又は還元剤：

有効塩素の捕捉剤として、硫酸アンモニウム、尿素、塩酸グアニジン、炭酸グアニジン、スルファミン酸グアニジン、二酸化チオ尿素、モノエタノールアミン、

ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、又グリシン、グルタミン酸ナトリウム等で代表されるアミノ酸及び牛血清アルブミン、カゼインなどの蛋白質、更には蛋白質の加水分解、肉エキス、魚肉エキスなどが挙げられる。

還元剤としては、チオ硫酸塩、亜硫酸塩、亜ニチオン酸塩等のアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩等及びロンガリットC等が挙げられる。特に亜硫酸塩が好ましく、洗濯液中の酵素を安定化させる。

(7) 漂白剤：

過炭酸塩、過硼酸塩、スルホン化フタロシアニン亜鉛塩又はアルミニウム塩、過酸化水素など。漂白洗浄剤とする場合は、特に過炭酸ナトリウムが効果的であり、配合量は1～95重量%、更に5～95重量%、特に20～95重量%とするのが好ましい。

(8) 蛍光染料：

通常洗浄剤に用いられる蛍光染料。

(9) 可溶化剤：

液体洗剤の場合には次のような可溶化剤を用いることができる。

エタノールなどの低級アルコール、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩などの低級アルキルベンゼンスルホン酸塩、プロピレングリコールなどのポリオール類など。

(10) その他：

上記以外に、従来公知の香料、ケーキング防止剤、酵素の活性化剤、酸化防止剤、防腐剤、色素、青味付け剤、漂白活性化剤、酵素安定化剤、相調節剤等の洗剤に常用の成分を必要に応じて配合することができる。

本発明の洗浄剤組成物は、上記液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ及び上記公知の洗浄成分を組み合わせる常法に従い、製造することができる。洗浄剤の形態は、用途に応じて選択することができ、例えば液体、粉末、顆粒等とすることができる。また、本発明洗浄剤組成物は、衣料用洗浄剤、漂白洗浄剤、自動食器洗浄機用洗浄剤、配水管洗浄剤、義歯洗浄剤等として使用することができるが、特に衣料用洗浄剤、漂白洗浄剤又は自動食器洗浄機用洗浄剤として好適に使用することができる。

## 実施例

次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

### 実施例 1

特開平 3 - 1 0 8 4 8 2 号公報の実施例 1 に記載のバチルス エスピー、K S M - A P 1 3 7 8 株を 1 % 可溶性澱粉（ポテト由来）、1. 0 % ポリペプトン、0. 5 % 酵母エキス、0. 1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0. 2 5 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0. 0 2 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0. 0 2 %  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0. 0 0 1 %  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0. 0 0 0 1 %  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  及び 1. 0 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を含む培地で、3 0 °C にて 3 日間好氣的に振盪培養し、得られた培養液から菌体を除き、上澄液を得た。次いで、該上澄液に硫安を 2 0 % 飽和になるように加え、5 °C にて 2 時間攪拌し蛋白を沈澱させ遠心分離にて除去した。更に該上澄液に硫安を 4 0 % 飽和になるように加え、5 °C にて 1 2 時間攪拌し蛋白を沈澱させた後、遠心分離により沈澱物を回収し、1 0 mM トリスー塩酸緩衝液（pH 8）に懸濁した後、同緩衝液にて一昼夜透析した。次いで透析液を高速液体クロマトを用いたゲル濾過（T S K - G 3 0 0 0 S W カラム）にて分画し、その活性画分を集めた。集められた活性画分は、限外濾過膜を用いて濃縮した後、1 0 mM トリスー塩酸緩衝液（pH 8）を用いて一夜透析した。斯くして得られる精製酵素は、ソディウムドデシル硫酸（S D S）ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度 7. 5 %）で単一のバンドを与え、活性収率は約 6. 4 % であった。

得られた酵素は前記の酵素化学的性質を有していた。

### 実施例 2

本発明の液化型アルカリ  $\alpha$ -アミラーゼを配合した洗浄剤と、従来の  $\alpha$ -アミラーゼ活性を有する酵素を配合した洗浄剤の洗浄力を比較した。なお、以下における D N S 試薬の調製法、酵素活性の測定・算出方法、汚染布の作製法、洗浄力の評価方法を下に示す。

#### < D N S 試薬の調製法 >

水酸化ナトリウム 1 6 g をイオン交換水 2 0 0 ml に溶解する。これに D N S 5



gを徐々に添加しながら溶解する。DNSを完全に溶解させた後、酒石酸ナトリウムカリウムを300g加える。完全に溶解させた後、イオン交換水にて1000mlに調製する。

〈可溶性澱粉分解活性の測定方法（ $\alpha$ -アミラーゼ配合量の決定）〉

（1）基質

ポテト由来可溶性澱粉（和光純薬社製）の0.5%水溶液

（2）基質溶液の調製

1.0gのポテト由来可溶性澱粉（和光純薬社製）を100mlのイオン交換水に溶解する。

（3）サンプルの調製

試験管に基質溶液を0.5ml入れ、そこに50mMリン酸緩衝液（pH7.0）を0.4ml、適当に希釈した酵素液0.1mlを加え、40℃の恒温槽中で30分間反応させる。反応終了後、DNS試薬を1ml添加し、沸騰水中で正確に5分間発色させ、発色後、直ちに氷水浴中に入れ冷却する。冷却後、イオン交換水4mlを加え、よく混合し、速やかに535nmにおける吸光度を測定する。

（4）ブランクの調製

試験管に基質溶液を0.5ml入れ、そこに50mMリン酸緩衝液（pH7.0）を0.4ml、DNS試薬を1ml添加し、沸騰水中で正確に5分間発色させ、発色後、直ちに氷水浴中に入れ冷却する。冷却後、イオン交換水4mlを加え、よく混合し、速やかに535nmにおける吸光度を測定する。

（5）検量線の作成

試験管に基質溶液を0.5ml入れ、そこに50mMリン酸（pH7.0）を0.4ml、これにブドウ糖濃度が260～1500 $\mu$ Mになるように検量線用ブドウ糖溶液を0.1ml加える。そこにDNS試薬を1ml添加し、沸騰水中で正確に5分間発色させ、発色後、直ちに氷水浴中に入れ冷却する。冷却後、イオン交換水4mlを加え、よく混合し、速やかに535nmにおける吸光度を測定する。横軸にブドウ糖濃度、縦軸に吸光度をとり傾きを求め、換算係数（F）を次式に従って算出する。

$$F = [1 / (\text{傾き})] \times [1 / 15] \times [1 / 0.1]$$

アミロースに対する分解活性を次式に従って算出する。

活性 (U/リットル) =  $\delta$  吸光度  $\times$  F  $\times$  希釈倍率

( $\delta$  吸光度 = サンプルの吸光度 - ブランクの吸光度)

#### 〈カレー人工汚染布の作製方法〉

ボンカレーゴールド中辛 (大塚食品社製) をミキサーにて粉碎し、綿布をこの液に接触、ブラッシングし、過剰付着汚れを脱落させた後、10 cm  $\times$  10 cm の試験片を調製する。

#### 〈洗浄力の評価方法〉

汚染前の原布及び洗浄前後の汚染布の 460 nm における反射率を自記色彩計 (島津製作所社製) にて測定し、次式から求まる洗浄率 (%) により、洗浄力を評価した。

$$\text{洗浄率 (\%)} = \frac{(\text{洗浄後の反射率} - \text{洗浄前の反射率})}{(\text{原布の反射率} - \text{洗浄前の反射率})} \times 100$$

#### 〈液体洗剤の調製〉

表 3 に示す成分の 5 倍濃度の溶液を調製し、1 N 塩酸にて pH を 7.0 に合わせる。次いでイオン交換水で表 3 に示す濃度にまで希釈し、pH 7.0 の液体洗剤を得た。

表 3

成 分	配合量 (重量%)
非イオン界面活性剤* <sup>1</sup>	20
アニオン性界面活性剤* <sup>2</sup>	20
クエン酸	5
モノエタノールアミン	5
ポリエチレングリコール (平均分子量 = 約 1 万)	1
エタノール	5.0
水	バランス
総計	100

\* 1 : アルキル基の平均炭素数 12 (直鎖)、エチレンオキサイド平均付加モ

ル数7のポリオキシエチレンアルキルエーテル

\* 2 : 炭素数12～14の直鎖アルキル基を有し、エチレンオキサイド平均付加モル数が2.5のポリオキシエチレンアルキル硫酸ナトリウム

得られた液体洗剤1.3 mlを4°DHの水1リットルに添加し、更にpH7.0において各種の $\alpha$ -アミラーゼを150 U/リットルとなるよう加えて洗浄液を調製した（実際の各酵素の添加量は1 ml以下になるので、酵素添加によるスケールアップは無視する。）。30℃に調整した該洗浄液1リットルにカレー人工汚染布を浸漬し、30分間静置する。静置後、洗剤溶液と人工汚染布をそのままターゴトメーター用ステンレスビーカー（1リットル）に移し、ターゴトメーターにて100 rpm 20℃、10分間攪拌する。流水下で充分すすいだ後、アイロンプレスを行い、反射率を測定し、洗浄率を求めた。この結果を表4に示す。表4より、活性が同じ条件であっても、本発明の液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼを配合した洗浄剤は従来の $\alpha$ -アミラーゼを配合した洗浄剤より優れた洗浄力を有することがわかる。

表 4

	$\alpha$ -アミラーゼ*	至適pH	等電点	反応特性	洗浄率 (%)
本発明品 1	(1)	8.5	9.2	液化型	80
比較品 1	(2)	6.1	5.4	液化型	60
比較品 2	(3)	10.0	4.9	糖化型	70
比較品 3	(4)	5.2	3.7	糖化型	55
比較品 4	(5)	7.0	6.5	糖化型	55
比較品 5	(6)	5.6	7.2	液化型	55
比較品 6	なし	—	—	—	50

\* : (1) バチルス エスピー. KSM-AP1378 由来.

分子量約50,000 (本発明のアミラーゼ)

(2) バチルス サブチリス由来 (和光純薬社製)

(3) バチルス エスピー. KSM-AP1378 由来.

分子量約200,000 (特開平3-108482号公報記載のブ

ルラーゼ活性及び $\alpha$ -アミラーゼ活性を有する酵素)

(4) アスペルギルス オリザエ由来 (シグマ社製)

(5) ブタ膵臓由来 (シグマ社製)

(6) バチルス リケニホルミス (ターマシル, ノボ社製)

### 実施例 3

以下のようにして調製した洗剤粒子と、アルカリ $\alpha$ -アミラーゼの造粒品とをドライブレンドして表 5 に示す組成の粒状洗剤を調製し、洗浄力を評価した。

#### 〈洗浄剤の製法〉

(1) 表 5 に示す成分 ( $\alpha$ -アミラーゼ以外) のうち、4 A 型ゼオライト 10%、蛍光増白剤及び香料を除いた成分からなる 50% 水分量のスラリー混合物を調製し、噴霧乾燥して洗剤生地粒子を得る。これをハイスピードミキサーに入れて粉碎造粒し、先に除いておいた成分を添加して洗剤粒子を得た (本発明品 3, 6 以外)。

(2) 表 5 に示す本発明品 3 の成分 ( $\alpha$ -アミラーゼ以外) のうち、非イオン界面活性剤、4 A 型ゼオライト 10%、吸油担体、蛍光増白剤及び香料を除いた成分からなる 50% 水分量のスラリー混合物を調製し、噴霧乾燥して洗剤生地粒子を得る。これをハイスピードミキサーに入れて粉碎造粒し、先に除いておいた成分を添加して洗剤粒子を得た (本発明品 3)。

(3) 表 5 に示す本発明品 6 の成分 ( $\alpha$ -アミラーゼ以外) のうち、非イオン界面活性剤、4 A 型ゼオライト 10%、蛍光増白剤及び香料を除いた成分をレディゲミキサーにて攪拌しながら非イオン界面活性剤を徐々に添加する。添加後、残る成分を添加して洗剤粒子を得た (本発明品 6)。

(4) 実施例 1 で得られた液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼを芒硝と少量のポリエチレングリコールで造粒し、(1) ~ (3) で得た洗剤粒子とドライブレンドし、表 5 に示す組成の粒状洗剤を得た。

なお、得られた粒状洗剤の平均粒径及びかさ密度を下に示す。

本発明品 2, 4, 5, 7 ~ 9, 比較品 7 ~ 9 :

平均粒径 400 ~ 500  $\mu\text{m}$ , カサ密度 750 ~ 780  $\text{g}/\text{cm}^3$

本発明品 3 : 平均粒径 400  $\mu\text{m}$ , カサ密度 770  $\text{g}/\text{cm}^3$

本発明品 6 : 平均粒径  $450\ \mu\text{m}$ 、かさ密度  $800\ \text{g}/\text{cm}^3$

〈評価方法〉

得られた粒状洗剤を、 $4^\circ\text{DH}$ の水に添加して $0.0833\%$ 水溶液の洗浄液を調製した。 $30^\circ\text{C}$ に調整した該洗浄液1リットルに、実施例2と同様にして調製したカレー人工汚染布を浸漬し、10分間静置する。静置後、洗剤溶液と人工汚染布をそのままターゴトメーター用ステンレスビーカー（1リットル）に移し、ターゴトメーターにて $100\ \text{rpm}$   $20^\circ\text{C}$ 、10分間攪拌する。流水下で充分すすいだ後、アイロンプレスを行い、実施例2と同様にして反射率を測定し、洗浄率を求めた。この結果を表5に示す。

組 成 (重量%)	本 発 明 品								比 較 品		
	2	3	4	5	6	7	8	9	7	8	9
アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ <sup>*1</sup>	2	2	5	6	6	2	5	6	0	0	0
牛脂石鹼 <sup>*2</sup>	0	0	0	0	1.5	0.5	0	0	0.5	0	0
炭酸ナトリウム	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
炭酸カリウム	0	5	0	0	0	0	0	3	0	0	0
J I S 2号ケイ酸ナトリウム	10	10	10	10	0	10	10	10	0	0	0
ゼオライト 4 A型 <sup>*3</sup>	30	20	30	30	30	20	20	20	30	30	30
非イオン性界面活性剤 <sup>*4</sup>	0	10	0	0	20	3	3	3	0	0	0
アニオン性界面活性剤 a <sup>*5</sup>	20	10	18	18	0	20	20	20	20	20	20
アニオン性界面活性剤 b <sup>*6</sup>	20	10	20	20	0	10	10	10	20	20	20
ポリエチレングリコール <sup>*7</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ポリアクリル酸ナトリウム <sup>*8</sup>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
吸油担体 <sup>*9</sup>	0	5	0	0	10	0	0	0	0	0	0
蛍光増白剤 <sup>*10</sup>	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
香料	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
硫酸ナトリウム	バ ラ ン ス								バ ラ ン ス		
総 計	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
洗 浄 率 (%)	74	72	77	81	82	75	80	81	60	61	61

- \* 1 : バチルス エスピー, K S M - A P 1 3 7 8 由来,  
分子量約 5 0, 0 0 0 (液化型アルカリ  $\alpha$ -アミラーゼ),  
比活性 3, 0 0 0 U / g
- \* 2 : 炭素数 1 2 ~ 1 4, 中和度 1 0 0 %
- \* 3 : 平均粒径 0. 9  $\mu$  m
- \* 4 : ポリオキシエチレンアルキルエーテル  
(E O 平均付加モル数 = 8, アルキル基炭素数 = 1 2)
- \* 5 : 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム  
(アルキル基炭素数 = 1 2 ~ 1 6)
- \* 6 : アルキル硫酸ナトリウム (アルキル基炭素数 = 1 2 ~ 1 4)
- \* 7 : 平均分子量約 8, 0 0 0, 配合量は、 $\alpha$ -アミラーゼ粒子中のものを除く。
- \* 8 : 平均分子量約 1 3, 0 0 0
- \* 9 : トクシール N R (徳山曹達社製)
- \* 1 0 : テノパール C B S (チバガイギー社製)

#### 実施例 4

表 6 に示す組成の液体洗剤を調製し、実施例 2 と同様に洗浄試験を行い、洗浄率を求めた。この結果を表 6 に示す。

表 6

組 成 (重量%)	本 発 明 品			比 較 品	
	10	11	12	10	11
アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ <sup>*1</sup>	2	5	5	0	0
クエン酸	2	2	2	2	2
非イオン性界面活性剤 <sup>*2</sup>	20	15	20	20	15
アニオン性界面活性剤 <sup>*3</sup>	20	10	15	20	20
ポリエチレングリコール <sup>*4</sup>	1	1	1	1	1
モノエタノールアミン	3	3	3	3	3
蛍光増白剤 <sup>*5</sup>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
エタノール	5	5	5	5	5
水	バ ラ ン ス			バランス	
総 計	100	100	100	100	100
洗 淨 率 (%)	70	68	71	50	52

\* 1 : バチルス エスピー. KSM-AP1378 由来.

分子量約 50,000 (液化型アルカリ  $\alpha$ -アミラーゼ), 比活性  
3,000 U/ml

\* 2 : ポリオキシエチレンアルキルエーテル

(EO 平均付加モル数 = 7, アルキル基炭素数 = 12 ~ 14)

\* 3 : ポリオキシエチレンアルキル硫酸ナトリウム

(EO 平均付加モル数 = 2.5, アルキル基炭素数 = 12 ~ 14)

\* 4 : 平均分子量約 8,000

\* 5 : チノパール CBS (チバガイギー社製)

#### 実施例 5

表 7 に示す組成のうち、過炭酸ナトリウムとソーダ灰（デンス灰）を攪拌混合しながら、ポリアクリル酸ナトリウム 40% 水溶液及び直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム又は非イオン性界面活性剤を添加した。次いで実施例 3 で用いた液化型アルカリ  $\alpha$ -アミラーゼの造粒物を添加し全体的に均一になる程度に



攪拌することにより、表 7 記載の漂白洗浄剤を得た。

漂白条件は 0.05% 水溶液、40℃、30 分間とする以外は実施例 3 と同じ条件とし、洗浄率を求めた。結果を表 7 に併せて示した。

表 7

(重量%)

	本 発 明 品			比較品
	13	14	15	12
過炭酸ナトリウム* <sup>1</sup>	80.0	80.0	80.0	80.0
炭酸ナトリウム (デンス灰)	16.5	16.0	16.5	17.0
アニオン性界面活性剤* <sup>2</sup>	2.0	2.0	—	2.0
非イオン性界面活性剤* <sup>3</sup>	—	—	2.0	—
ポリアクリル酸ナトリウム* <sup>4</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0
アミラーゼ (造粒品)	0.5	1.0	0.5	0
洗浄率 (%)	55	58	54	48

\* 1 : 粒径 500～700  $\mu$ m

\* 2 : 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (炭素数 12～14)

\* 3 : ポリオキシエチレンアルキルエーテル

(アルキル基の炭素数 12～14, エチレンオキサイド平均付加モル数 12)

\* 4 : 平均分子量 8000

#### 実施例 6

表 8 に示す組成の自動食器洗浄用洗剤を、実施例 5 と同様にして調製した。

表 8

(重量%)

	本 発 明 品			
	16	17	18	19
ブルロニック L-61 <sup>*1</sup>	4	—	4	4
ソフタノール EP-7085 <sup>*2</sup>	—	4	—	—
クエン酸 3 ナトリウム	30	30	—	—
EDTA	—	—	30	—
トリポリリン酸ナトリウム	—	—	—	30
過炭酸ナトリウム	20	20	20	20
炭酸ナトリウム	20	20	20	20
1号珪酸ナトリウム	10	10	10	10
ポリアクリル酸ナトリウム塩 <sup>*3</sup>	4	4	4	4
芒硝	バランス	バランス	バランス	バランス
アミラーゼ (造粒品)	3	3	3	3

\*1 : ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体 (平均分子量 2000, 旭電化工業社製)

\*2 : 炭素数 12~14 の sec-アルコールのエチレンオキサイド 7 モル及びプロピレンオキサイド 8.5 モル付加物 (日本触媒工業社製)

\*3 : 平均分子量 8000

得られた自動食器洗浄用洗剤について、下記条件で洗浄評価を行ったところ、いずれも優れた洗浄効果が得られ、アミラーゼを配合しない場合と比べ優位性が示された。

#### 〈汚染皿の調製〉

軟質の炊き上がり米飯を 30 分間室温に放置し、3 g を直径 2.5 cm の磁性の皿に引き伸ばし塗布し、室温で一昼夜風乾したもの 6 枚を試験に供する。

#### 〈米飯汚れの洗浄力評価方法〉

洗浄後の皿の米飯の残存液を、ヨード呈色反応によって、肉眼判定する。

#### 〈洗浄力試験法〉

#### 洗浄条件：

- ・ 使用機種；松下電器（株）製全自動食器洗い機NP-720

洗浄剤水溶液が回転ノズルから噴射され、その噴射軌道上面に設置された食器類を洗浄する形式のもの。

- ・ 洗浄温度；5℃から55℃まで徐々に上昇する。
- ・ 使用水；硬度3.5°DHの水
- ・ 洗浄剤濃度；0.2重量%
- ・ 洗浄時間；洗浄20分—すすぎ20分
- ・ 洗浄時の循環水量；2.5リットル

#### 産業上の利用可能性

本発明の液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼは、従来のアルカリ $\alpha$ -アミラーゼに比較して澱粉又は澱粉系多糖類等の基質を高ランダムに分解する液化型活性を有し、かつアルカリ側に至適pHを有し（8.0～10.0）、更に広いpH範囲においても極めて安定である。また、至適温度も45～55℃であり、熱安定性も50℃までは極めて安定である。更に、界面活性剤等の洗浄剤配合成分によっても殆ど阻害を受けない。また、従来知られているアルカリ $\alpha$ -アミラーゼの等電点が3.0～8.0程度であるのに対し、本発明の液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼは従来になかった8.5を超える高い等電点（8.7～9.7、具体的には9.2付近）を有し、この酵素の特性を利用してゲル等電点電気泳動法、密度勾配等電点法、イオン交換クロマトグラフィー等により簡易に精製酵素を得ることができるため、工業的に極めて大きな意義を有するものである。

また、本発明の液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼを配合した洗浄剤組成物は、特に食べこぼし汚れに対して優れた洗浄力を有するものである。

本発明の液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼが従来のアミラーゼよりも優れた洗浄力を有する理由としては、高ランダム分解性である液化型特性以外にも高い等電点による影響もあると考えられる。すなわち、一般に繊維は水中でマイナスに帯電するが、洗濯液のpHが高い場合、酵素の等電点が低いと酵素もマイナスに帯電し、お互いに反発しやすくなる。しかし本発明の液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ

は等電点が高いため、洗濯液中でマイナスに帯電せず、繊維表面の汚れとの反発が少なくなる結果、洗浄力の向上に寄与するものと考えられる。

## 請 求 の 範 囲

1. 次の酵素学的性質を有する液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ。

## 1) 作用

澱粉、アミロース、アミロペクチン及びそれらの部分分解物の $\alpha$ -1, 4グルコシド結合を分解し、アミロースからはグルコース（G1）、マルトース（G2）、マルトトリオース（G3）、マルトテトラオース（G4）、マルトペンタオース（G5）及びマルトヘキサオース（G6）を生成する。ただしプルランには作用しない。

## 2) 等電点

等電点電気泳動法による等電点が8.5を超える。

2. 等電点が、8.7～9.7である請求項1記載の液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ。

3. 至適pHが、8.0～10.0である請求項1又は2記載の液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ。

4. 次の酵素学的性質を有する液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ。

## 1) 作用

澱粉、アミロース、アミロペクチン及びそれらの部分分解物の $\alpha$ -1, 4グルコシド結合を分解し、アミロースからはグルコース（G1）、マルトース（G2）、マルトトリオース（G3）、マルトテトラオース（G4）、マルトペンタオース（G5）及びマルトヘキサオース（G6）を生成する。ただしプルランには作用しない。

## 2) 作用pH及び至適pH

pH5.0～11.0の範囲で作用し、至適pHは8.0～9.0である。

## 3) pH安定性

pH6.5～10.0の範囲で極めて安定であり、pH5.0～10.5においても、50%以上の活性を維持する（40℃、30分間処理）。

## 4) 作用温度範囲及び最適温度

20～80℃の範囲で作用し、最適作用温度は45～55℃である。

## 5) 温度安定性

50℃以下で極めて安定である（pH8.5のグリシン-食塩-水酸化ナトリウム緩衝液中、30分間処理）。

#### 6) 分子量

ソディウムドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量は50,000±5,000である。

#### 7) 等電点

等電点電気泳動法による等電点は9.2付近である。

#### 8) 金属塩の影響

K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>及びAl<sup>3+</sup>に対して極めて安定である。

#### 9) 界面活性剤の影響

直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルキル硫酸エステルナトリウム、ポリオキシエチレンアルキル硫酸エステルナトリウム、アルキルスルホン酸ナトリウム、石鹼又はポリオキシエチレンアルキルエーテルの界面活性剤によってほとんど活性阻害を受けない。

5. N末端アミノ酸領域に、Asn-Gly-Thr-Met-(Met)-Gln-Tyr-Phe-Glu-Trpの配列を有する請求項1～4のいずれかに記載の液化型アルカリα-アミラーゼ。

6. バチルス属に属する液化型アルカリα-アミラーゼ生産菌を培養し、その培養物から請求項1～5のいずれかに記載の液化型アルカリα-アミラーゼを採取することを特徴とする液化型アルカリα-アミラーゼの製造法。

7. 液化型アルカリα-アミラーゼ生産菌が、バチルス エスピー (Bacillus sp.) KSM-AP1378 (FERM BP-3048) である請求項6記載の液化型アルカリα-アミラーゼの製造法。

8. 請求項1～5のいずれかに記載の液化型アルカリα-アミラーゼを含有する洗浄剤組成物。

9. 液化型アルカリα-アミラーゼが、バチルス エスピー (Bacillus sp.) KSM-AP1378 (FERM BP-3048) により生産されたものである請求項8記載の洗浄剤組成物。

10. 陰イオン性界面活性剤及び／又は非イオン性界面活性剤を 0.5 ～ 60 重量％含有する請求項 8 又は 9 記載の洗浄剤組成物。

11. 液化型アルカリ  $\alpha$ -アミラーゼの配合量が、可溶化澱粉に対する分解活性で、1 ～ 10,000 U/g である請求項 8 ～ 10 のいずれかに記載の洗浄剤組成物。

☒ 1

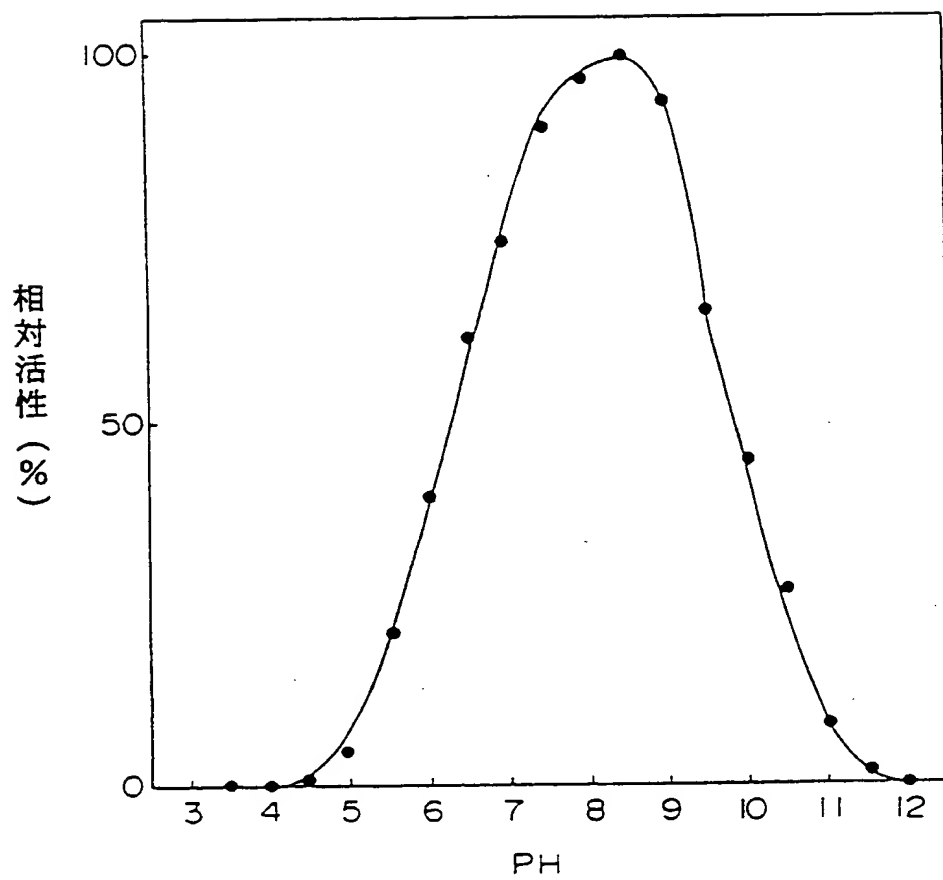




図 2

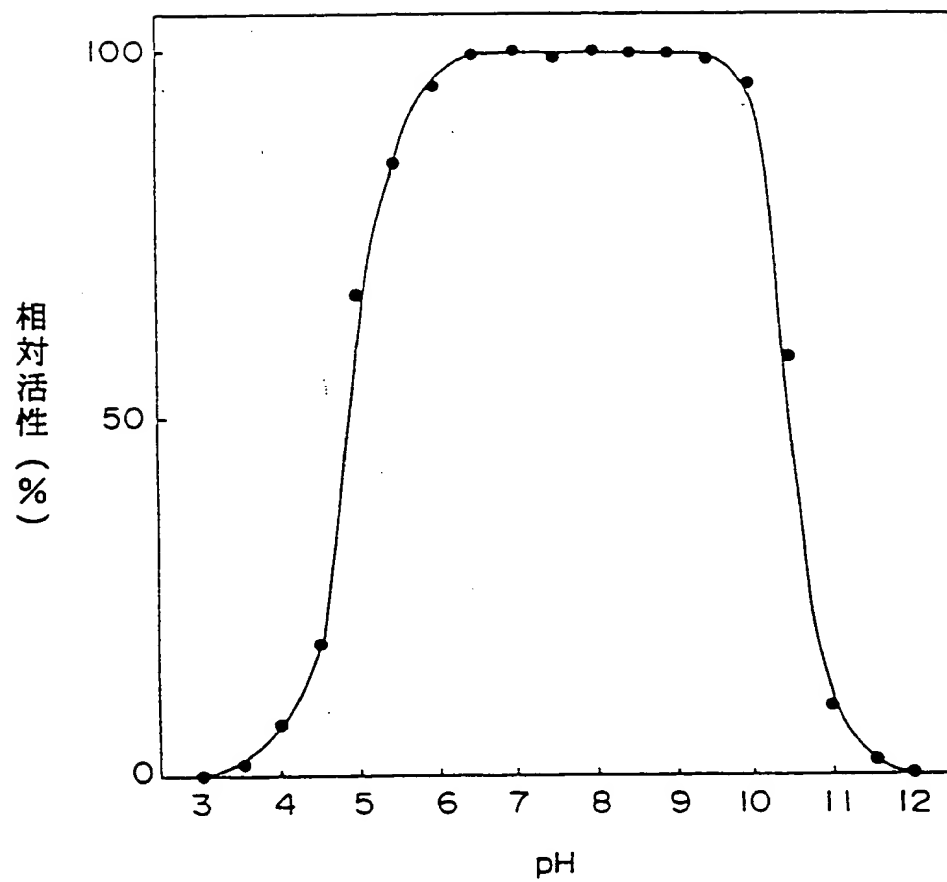


図 3

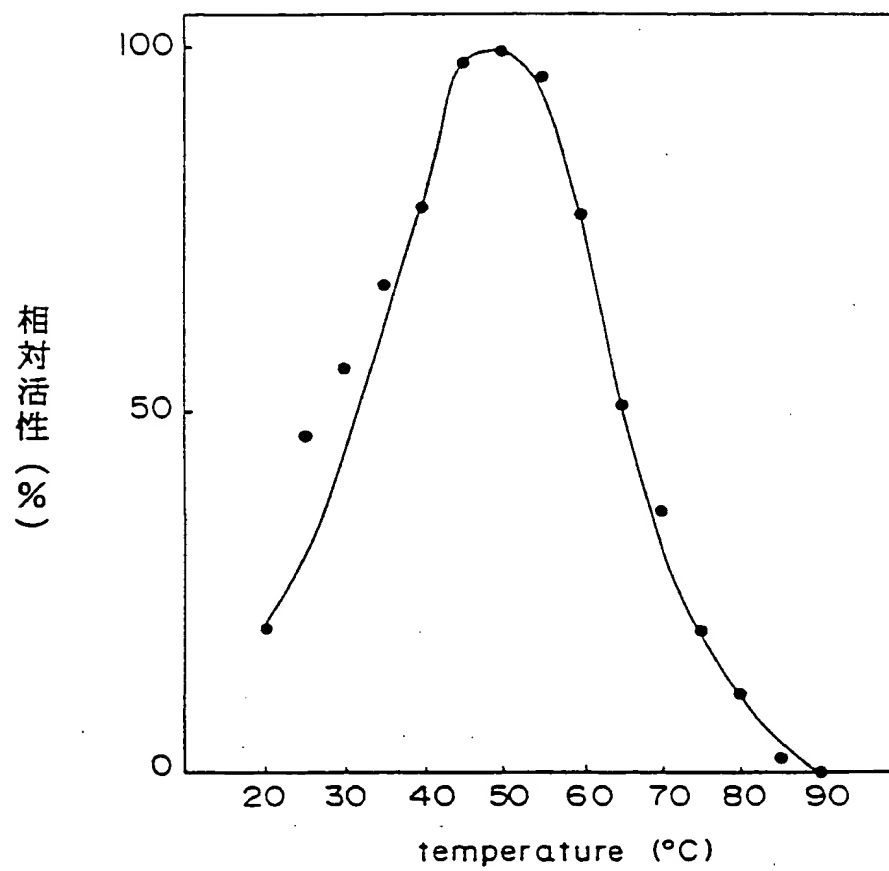


図 4

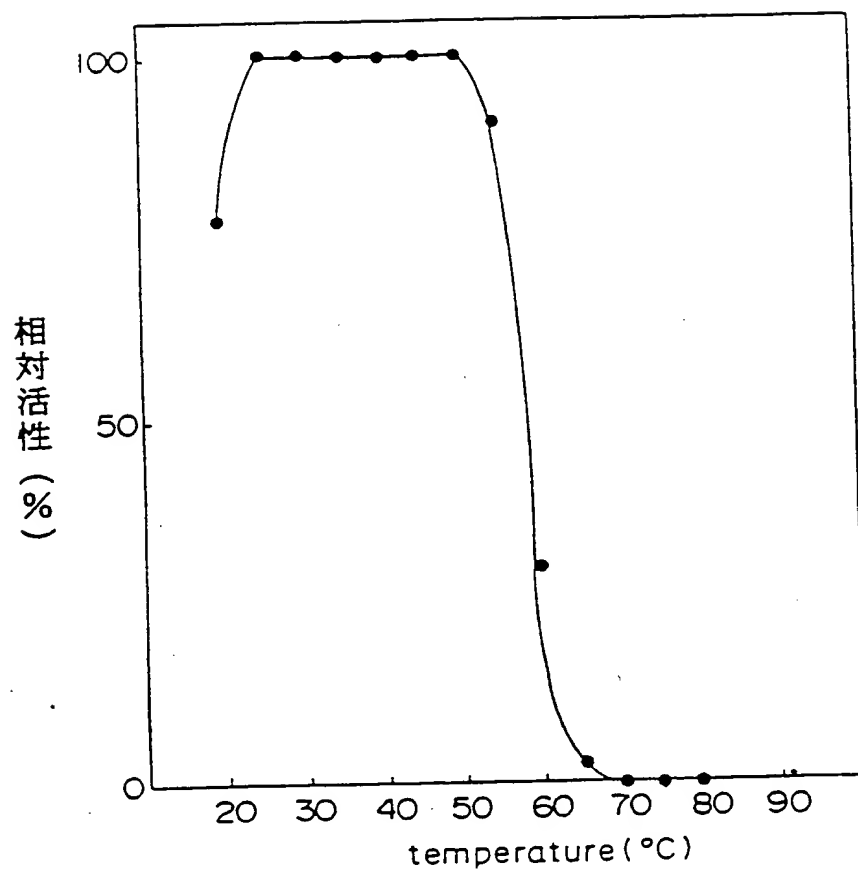
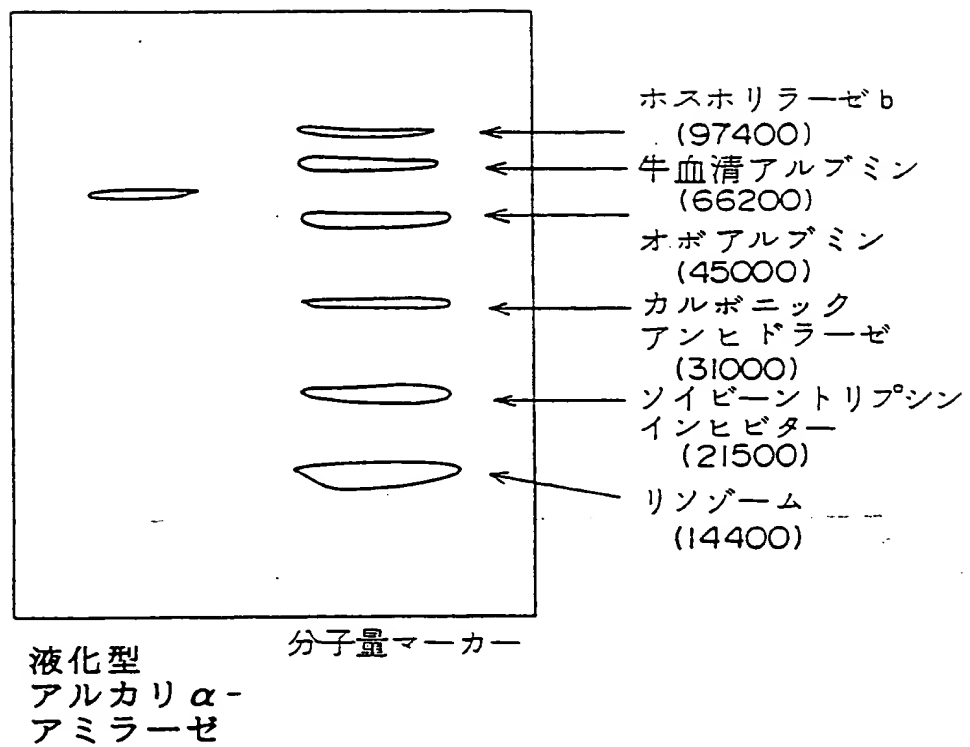


図 5



國際樣式 INTERNATIONAL FORM

REC'D

NYJP94/00805

**WIPO ESTABLISHMENT OF THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7. 1に従い  
発行される

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

## 原寄託についての受託証

氏名 (名称)

我 啓

當証者

殷

あて名 (印) 321-34

栃木県芳賀郡市貝町大字西羽 2 6 0 6

## 1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

*Bacillus* sp. KSM-AP1378

(受託番号)

微工研类密第 3048 号

( FERM BP- 3048 )

## II. 科学的性質及び分類学上の位置

I 属の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

## ☒ 科学的性質

#### ☒ 分類学上の位置

#### 四、受領及公受託

本国際委託当局は、平成 元年 7月24日（原委託日）に受領した1箇の微生物を受託する。

(平成 元年 7月24日に寄託された微工研調査第 P- 10886 号より移管)

#### IV. 國際寄託當局

通商產業省工業技術院微生物工業技術研究所

名称:

А р с н с у

Research Institute  
Science and Technology

海 國

給 本 費

Tomoo

. DIRECTOR GENERAL.

氏名 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号 305)  
 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
 305, JAPAN

平成 2年(1990) 8月 8日

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/00805

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N9/28, C11D3/386

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N9/28, C11D3/386

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS BIOSIS WPI, WPI/L

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 49-124285 (Sanraku-Ocean Co., Ltd.), November 28, 1974 (28. 11. 74) & JP, B, 77031949, (Family: none)	1-9
A	JP, A, 4-058885 (Showa Denko K.K.), February 25, 1992 (25. 02. 92), (Family: none)	1-9
A	J. Biochem, Vol. 98, No. 5 (1985), Yuuki, Toshifumi et al. Complete nucleotide Sequence of a gene coding for heat-and pH-stable alpha-amylase of Bacillus licheniformis : Comparison of the amino acid sequences of three bacterial liquefying alpha-amylase deduced from the DNA sequewces P. 1147-1156	1-6
A	JP, A, 4-500756 (Gist-Brocades N.V.), February 13, 1992 (13. 02. 92) & WO, A, 9100353 & EP, A, 410498 & PT, A, 94560 & AU, A, 9059538 & FI, A, 9100907 & BR, A, 9006818	1-5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

August 9, 1994 (09. 08. 94)

Date of mailing of the international search report

August 23, 1994 (23. 08. 94)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/00805

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	& CN, A, 1050220 & DD, A9, 301620 & AU, B, 638263  JP, A, 3-290498 (Kao Corp.), December 20, 1991 (20. 12. 91) & EP, A, 450627 & CA, A, 2039917 & JP, A, 3287698 & EP, A3, 450627 & US, A, 5316691	8-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N9/28, C11D3/386

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N9/28, C11D3/386

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS BIOSIS WPI, WPI/L

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, A, 49-124285 (三栄オーシャン株式会社), 28. 11月. 1974 (28. 11. 74) & JP, B, 77031949 (ファミリーなし)	1-9
A	JP, A, 4-058885 (昭和電工株式会社), 25. 2月. 1992 (25. 02. 92) (ファミリーなし)	1-9
A	J. Biochem, 第98巻第5号 (1985), Yunki, Toshifumi et al. Complete nucleotide	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日  
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献  
(理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日  
の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と  
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため  
に引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規  
性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文  
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性  
がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 08. 94

国際調査報告の発送日

23.08.94

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐伯裕子

4 B 9 3 5 9

電話番号 03-3581-1101 内線

3449



C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	<p>Sequence of a gene coding for heat- and pH-stable alpha-amylase of <i>Bacillus licheniformis</i>: Comparison of the amino acid sequences of three bacterial liquefying alpha-amylase deduced from the DNA sequences p. 1147-1156</p>	
A	<p>JP, A, 4-500756 (ギスト プロカデス ナムローゼ フェンノートシャップ), 13. 2月. 1992 (13. 02. 92) &amp;WO, A, 9100353 &amp;EP, A, 410498 &amp;PT, A, 94560 &amp;AU, A, 9059538 &amp;FI, A, 9100907 &amp;BR, A, 9006818 &amp;CN, A, 1050220 &amp;DD, A9, 301620 &amp;AU, B, 638263</p>	1-5
A	<p>JP, A, 3-290498 (花王株式会社), 20. 12月. 1991 (20. 12. 91) &amp;EP, A, 450627 &amp;CA, A, 2039917 &amp;JP, A, 3287698 &amp;EP, A3, 450627 &amp;US, A, 5316691</p>	8-11